

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 公表特許公報 (A)

⑮ 特許出願公表

昭59—501933

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号  
A 23 C 21/00 6760—4B  
21/02 6760—4B  
A 61 K 7/00 7306—4C  
7/16 6675—4C  
C 12 N 1/14 6712—4B  
1/20 7115—4B

⑰ 公表 昭和59年(1984)11月22日

部門(区分) 1(1)  
審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

(全 19 頁)

⑱ 清澄化した酪産乳漿ラクトース透過物を培地および他の商業的に有用な製品への転換

⑲ 特 願 昭58—503300  
⑳ 出 願 昭58(1983)9月6日  
㉑ 翻訳文提出日 昭59(1984)5月14日  
㉒ 国際出願 PCT/US83/01342  
㉓ 国際公開番号 WO 84/01104  
㉔ 国際公開日 昭59(1984)3月29日  
㉕ 優先権主張 ⑲1982年9月14日⑲米国(US)  
⑲418067  
㉖ 発 明 者 ケギンス・カスリーン・エム  
アメリカ合衆国21061メリーランド・グ  
レンバーニー・セカンドアベニュー204

㉗ 発 明 者 デービス・アン・シー  
アメリカ合衆国20740メリーランド・カ  
レツジパーク・アパートメント103チエ  
ロキーストリート4712  
㉘ 出 願 人 アイジーアイ・バイオテクノロジー・イ  
ンコーポレイテッド  
アメリカ合衆国21045メリーランド・コ  
ロンビア・レッドブランチロード9110  
㉙ 代 理 人 弁理士 赤岡通夫  
㉚ 指 定 国 AU, BE (広域特許), CH (広域特許),  
DE, DK, FR (広域特許), GB, JP,  
LU (広域特許), NL (広域特許), SE  
(広域特許), US, US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. a) 約7以下のpHを有する酪産乳漿ラクトース透過物のpHを約8ないし10の間のpHへ上昇し、ラクトースリッチ水性溶質相と、そして前記透過物を121℃および15psiにおいてオートクレーピングする時沈殿する該透過物の溶解固形分の実質上すべてを含有する微結晶混濁分画を生成させそれにより該アルカリ性透過物をそのようにオートクレーブ処理する時約7のpHを有する明るい着色した溶質が得られるようにし、  
b) 該微結晶混濁分画を該溶質相から分離し、  
c) 該微結晶混濁分画および該溶質相の少なくとも一方を回収することを含む酪産乳漿ラクトース透過物を商業的に有用な製品へ転換する方法。
2. pHは約9へ上昇させられる第1項の方法。
3. 前記微結晶混濁分画は前記溶質相から20—100kdaI膜フィルターを遠す限外口過によって分離される第1項の方法。
4. 分離した溶質相のpHを約6.8—7.1へ下げることとをさらに含む第1項の方法。
5. pHは該溶質相へ無毒性リウス酸の添加によって下げられる第4項の方法。
6. pHは該溶質相を無菌微生物培地が生成するようにオートクレーブ処理することによって下げられる第4項の方法。
7. pHは該溶質相へ外来酸の添加なしで下げられる第5項の方法。
8. 分離された溶質相を10重量%未満の水分含量へスプレー乾燥することをさらに含む第1項の方法。

9. 約100kdaI以下の分子量を有する成分を通す孔径を有するフィルターによって保留される成分を実質上含まず、かつ約10kdaI以上の分子量を有する成分を保留する孔径を持つフィルターを通過する成分の実質上すべてを含有する、第1項の方法によって得られた溶質相より実質的になる、適当な生育条件で微生物の生育を支持することができる微生物培養培地。
10. 約30kdaIの分子量を有する成分を透過させる孔径を有するフィルターによって保留される成分を実質上含まない第9項の微生物培養培地。
11. 約6.8—7.1のpHを有する第9項の微生物培養培地。
12. 約3.5% (wt/vol) の固形分含量を有する第9項の微生物培養培地。
13. 第9項による無菌微生物培養培地。
14. 約10重量%未満の水分含量を有する自由流動性粉末の形の第9項による微生物培養培地。
15. 外来の無毒性同化炭素源の生育促進量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
16. 前記炭素源はグルコースである第15項の微生物培養培地。
17. 外来の無毒性同化炭素源の生育促進量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
18. 前記炭素源はイースト抽出物、イースト自己消化物、加水分解したカゼイン、大豆タンパクまたは大豆タンパク加水分解物、またはそれらの混合物である第17項の微生物培養培地。
19. 無毒性ゲル化剤の有効量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
20. 約0.25%の水溶性固形物イースト抽出物をさらに含み、約3.

- 5% (wt/vol) の固形分含量を有することを特徴とする、醗酵培地の栄養生育特性を持つ第9項の微生物培養培地。
21. 加水分解したカゼイン約0.25-0.5%、イースト抽出物約0.05%および約0.05-0.1%の総グルコース含量をさらに含み、ベンアッセイブロスまたは栄養ブロスに比肩し得る栄養生育特性を有する第9項の微生物培養培地。
22. その内へ酸素の拡散を減らす無毒性ゲル化剤の有効量と、加水分解したカゼイン約0.25-0.5%と、イースト抽出物約0.5%と、システイン HCl 約0.05%と、約0.5%の総グルコース含量とをさらに含み、チオグリコレートブロスに比肩し得る栄養生育特性を有する第9項の微生物培養培地。
23. 加水分解したカゼイン約0.25%、イースト抽出物約1%、システイン HCl 約0.2%、ヘミン約0.05%、ビタミンK<sub>a</sub> 約0.1%、約0.5%の総グルコース含量、約7.8のpH、-150mVまたはそれ以下の酸化還元電位、および酸化還元比色定量用指示薬の有効量をさらに含み、嫌気性バクテリアの培養に適した第9項の微生物培養培地。
24. 前記指示薬は約0.001%のレザズリンである第23項の微生物培養培地。
25. 生存している微生物と適当なその栄養培地を含むバルク微生物スターター混合物において、前記スターター混合物は第9項の微生物培養培地である改良。
26. 前記微生物はチーズ生産微生物である第25項のバルクスターター混合物。
27. 同化炭素、窒素およびリン源を含有する培地中において深部培養
40. 油は食用植物油である第39項の方法。

- 栄養生育条件下において生体外において微生物を生育する方法において、前記培地は第9項の培地である改良。
28. 微生物はバクテリアである第27項の方法。
29. 微生物は *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Kluyveromyces* および *Saccharomyces* 種よりなる群から選ばれる第27項の方法。
30. 微生物は *Bacillus cereus* subs. *thuringiensis* である第27項の方法。
31. 微生物は *Aspergillus*, *Penicillium* および *Streptomyces* 種よりなる群から選ばれる第27項の方法。
32. 微生物は *Penicillium notatum* である第31項の方法。
33. 微生物は *Streptomyces griseus* である第31項の方法。
34. 微生物は臨床的分離物から得られる第27項の方法。
35. 無味、無臭、白色自由流動性粉末を生成するように分離した微結晶湿潤分画を乾燥することをさらに含む第1項の方法。
36. 第35項の方法によって得られた無味、無臭、白色自由流動性粉末より実質的に無毒性食品級添加剤。
37. 添加した湿潤剤、安定剤、乳化剤、または濃化剤の有効量を含む食品、医薬品、化粧品または飼料組成物において、前記剤は第36項の組成物である改良。
38. 複数の不混和物質へ乳化剤または安定剤を添加することによりそれらの安定なエマルジョンまたはサスペンションを形成する方法において、前記乳化剤または安定剤は第36項の微結晶湿潤分画である改良。
39. 前記不混和性物質はその主要部分として油と水を含んでいる第38項の方法。

## 明 細 書

清澄化した酪酸乳糖ラクトース透過物を培地および他の商業的に有用な製品への転換

## 本発明の説明

## 関連出願への参照

この出願は、共通して譲渡された1982年9月14日出願された米国特許出願No. 06/418,067および1983年3月2日出願されたNo. 06/471,570の一部継続であり、それらの内容を参照にこれに取り入れる。

## 本発明の技術分野

本発明は、酪酸乳糖分画を商業的に有用な製品への変換方法、このように製造された新規な製品、およびそれらの使用方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、広範囲の微生物の良好な発育を支持することができるラクトースリッチ水性溶液分画と、そして食品、医薬品、化粧品および他の工業における広範囲の応用にそれを有用とする乳化および懸濁性を有する乾燥した自由流動無臭無味組成物へ変換することができる微結晶湿潤分画を製造するベースを持つ、実質上除タンパクした酪酸乳糖透過物(WLP)を処理する方法に関する。

## 背景技術

Alan G. Lane; J. Appl. Chem. Biotechnol. 27: 165-169 (1977) によって認められているように、チーズおよびカゼインの製造から生ずる乳糖の廃棄は、非常に大きい環境および経済問題を提供し、

合衆国における乳製品の年間生産量は1000万人口都市の下水と同等の汚染強度を持つと推定されている。

一部の乳製品は動物飼料として使用されるが(例えば Herbert R. Peerの米国特許第3,343,862号および第3,497,359号および Paul R. Austinらの米国特許第4,320,150号を見よ)、大部分は廃棄物と考えられ、そして慣例的方法で廃棄されている。限外ろ過(UP)技術の最近の発達は乳製品からカンパクを回収することを可能としたが、残った除タンパクした乳製品ラクトース透過物の廃棄は、それがラクトースの大部分(約45g/l)およびそのためもとの乳製品からの汚染強度(生物学的および化学的酸素要求量)を含有するので、重大な困難を提供する。

この問題の一アプローチにおいて、醗酵技術がラクトースを食品イースト、例えば *Kluyveromyces fragilis* へ変換し、それによりラクトース自体の限られた市場を克服しようとするために開発された。そのような方法は一般に乳製品または乳製品ラクトース透過物を、最初事前の濃縮なしに、そして後で Lane によって報告されたような透析培養技術によって醗酵させることを含む。乳製品ラクトース透過物に存在するラクトースの90%までを除去する能力を提供するけれども、この方法は限られた有用性の単一製品を得る不利益を持つ。

除タンパクした乳製品の透析連続醗酵は、例えば R.W. Steiber et al.; J. Dairy Sci., 63: 722-730 (1980) に報告されているように、*Lactobacillus* 細胞の生産へ応用されている。基質として除タンパクした乳製品を用い、フェーメンター内容物をアンモニアの添加によって5.5の一定pHに維持され、半透膜を渡って水に対して透析され、細胞生産は普通の連続醗酵の2倍であった。

を回収する方法を記載している。ラクトースの回収以外、Pedersonは沈澱または上清液の工業的または商業的用途を記載していない。Donald A. Grindstaffの米国特許4,036,999はpHを6.5以上へ調節し、そして不溶性固体をそれから分離することにより、粗酸性チーズの前処理を記載する。分離された固体は、カルシウムイオンを添加し、加熱し、そしてベーカー製品に非脂肪ミルク代用品として有用な製品を生成するように乾燥することによって処理される。今や本発明により採用される温度およびpHの特定の組合わせは、有用な同時生産物の独特の組合わせを与え、そして沈澱の溶解性をそれから除去される水の程度に応じて変えることができることが発見された。

#### 本発明の図示

本発明の一般的目的は、除タンパクした酪産乳製品透過物を工業的に有用な製品へ変換するための簡単にして安価な方法を提供することである。

本発明の全体目的は、除タンパクしたラクトースリッチ酪産乳製品分画を、微結晶質混濁物質(すなわち裸眼で観察できない顕微鏡的結晶よりなる)を含む少なくとも一分画と、少なくとも一種のラクトースリッチ水性溶質分画であって、両方とも多種類の工業的、商業的および臨床的用途を有する分画に変換する方法を提供することである。

本発明の主要目的は、ラクトースリッチ乳製品分画から誘導され、工業的醗酵培地、臨床診断培地、および微生物培養のための他の生育培地を配合するために有用なラクトースリッチ製品を提供することである。

甘い乳製品透過物および酸性乳製品透過物の両方は、Barbel Hahn-Bagerdal; Applied Biochemistry and Biotechnology 7: 43-45 (1982) に報告されているように、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび *Saccharomyces cerevisiae* を使用してエタノール生産の原料として使用されている。ラクトースの50%以上がエタノールへ変換されるが、溶出液は乳製品透過物原料の重量/単位容積を基にして2%エタノール収量以下を含んでいた。

微生物培地としての全乳製品の使用は Emel Celikkol; Mikrobiyol. Bul., 9 (4): 273-279 (1975) および U.S.S.R. 特許819,166 に報告されている。Chem. Abs. 84: 72629u および 95: 59904n にそれぞれ要約されているように、前者の方法は処理しない全乳製品を使用し、後者の方法は最初の乳製品からラクトースを除去し、そしてその中のタンパクを加水分解する。先行技術によってこれまで完全に説明されなかった理由により、これら方法のどちらも工業的または臨床グレードの培地のための広く普及した用途を得ていない。

乳製品コロイド沈澱は、例えば Syed N.H. Shah et al の米国特許4,143,174 によって記載されているように、食品級組成物への混濁化、安定化、乳化、濃化およびゲル化添加剤(一般に沈澱が使用される濃度に応じて)としての使用が発見された。Shah et al はコロイド沈澱から分離される上清液の有用な用途を記載しなかった。

酪産乳製品透過物から、温度、pHおよびそれらが生成される他の条件に応じて各種の固体を得ることができる。例えば Eusacheの米国特許4,042,275および4,042,576を見よ。Pedersonは米国特許4,202,909において、180-200度へ加熱によって沈澱を生成し、上清液をそれから分離することによって乳製品透過物からラクトース

本発明の他の目的はこれら培地を使用する微生物培養方法の改良を提供することである。

本発明の第2の主要目的は、乳化、懸濁化および/またはゲル化剤として有用な微結晶混濁製品を提供することである。

本発明のなお他の目的は、これら剤を使用する広い範囲の組成物を乳化および懸濁する改良された方法を提供することである。

本発明のさらに特定の目的は、食品、医薬剤、化粧品ベース、歯磨きペースその他に使用するための改良された食品グレード添加剤を提供することである。

明細書および請求の範囲を検討することにより、本発明のそれ以上の目的、特徴および利益は、本発明が関係する分野の当業者に対してもっと完全に明らかになるであろう。

#### 図面の簡単な説明

第1図および第2図は、本発明による現在好ましい方法および実際の応用のフローダイアグラムである。

第3ないし5図は、実施例15の方法によって測定した本発明の例証混濁分画のゼータ電位に対するpHの効果を示すグラフであり、ゼータ電位が少なくとも5mV(+でも-でも)である区域は安全なエマルジョンまたはサスペンションの形成のための一般に満足なpH範囲を示す。

第6図は、本発明の実施例10の方法に従って製造されたスプレー乾燥した工業グレード培地の商業的製剤の走査電子顕微鏡グラフ(SEM)である。

第7図は、第6図に示した培地がそれから製造された溶質相と同時に沈澱として得られた微結晶混濁分画のSEMである。

第8図は、除タンパクした酪産乳漿ラクトース透過物の異なるソースから同様に得られた微結晶混濁分画のSEMである。

第9図は、膜のもれによる高タンパクレベルを含有する乳漿ラクトース透過物の他のソースから同様に得られた微結晶混濁分画のSEMである。

#### 本発明を実施するための最良の形態

概して、本発明の前記および他の目的、特徴および利益は、その一面において、さもなければ透過物のオートクレービングに際し沈澱を生成する除タンパクした酪産乳漿ラクトース透過物から、a) オートクレービングに際し沈澱を生成しない、微生物培地として有用なラクトースリッチ水性溶質相と、b) 食品、医薬品、化粧品および他の組成物の混濁、安定、乳化および濃化を生ずるための食品グレード添加物として有用な微結晶混濁沈澱を生成するように、溶解した固形分を分離する方法を提供することによって達成される。

本発明は、微結晶混濁物質を含む少なくとも一つの製品と、そしてラクトースリッチ水性溶質相を含む少なくとも一分画を生成するように、ラクトースリッチ除タンパク酪産乳漿分画を処理する方法に関する。これら最終製品のめいめいは、本発明によって有用な組成物を製造するため、または工業的または商業的プロセスにおいて有用な物質を提供するためさらに処理することができる。特に、本発明による溶質相は、好気性および嫌気性酸酵プロセスを含む臨床用または工業用の微生物培地として有用である。本発明によって生成した微結晶混濁物質は、食品添加物、医薬組成物、化粧品その他として有用なタンパクを乳化またはゲル化するのに特に有用な、乳化および/またはゲル化剤として利用することができる。

するためゲル化剤が添加され、そして培地は適当な微生物で接触され、微生物は生育を許容され、概微生物および/または所望の生物学的生産物が単離される。もし液体培地として使用するならば、補給または無補給溶質分画はバッチ式または連続式プロセスに使用することができる。典型的なバッチ式プロセスにおいては、液体溶質分画は適当な生育条件で微生物で接触され、次々に大きいタンクへ移換(ステージング)される。所望の微生物または概微生物からの生物学的生産物が単離される。その代わりに、液体溶質分画は連続プロセスに使用でき、その場合微生物が培地と接触され、所望の細胞密度まで生育を許容される。栄養含有培地は培養物へ連続的に流入され、一方使用済栄養が同時に排出される。使用済栄養は集められ、そして所望の生物学的生産物がそれから除去される。

出発原料として使用し得る適当な除タンパクしたラクトース乳漿透過物(WLP)は商業的に入手することができ、または当業者に既知の技術により、硬質チーズ、例えばスイスまたはモザレラチーズ、または軟質チーズ例えばコテージチーズから得られた甘いまたは酸味酪産乳漿から製造することができる。ここで具合よく使用された商業的に入手し得る出発材料は、Leo H. Francisの米国特許第3,615,644に記載の方法によって製造したForemost-McKesson, Inc. ラクトース透過物(第6、8および9図)、および Express Food Companyの除タンパク乳漿シロップ固体(第7図)を含む。

本発明によって出発原料として適当なラクトースリッチ酪産透過物は、一般に例えば限外口通または他の膜分離技術によって除タンパクされる。その中の固形分含有パーセントは前処理に応じて変化し得る。WLP出発原料を製造するのに使用される限外口通装置お

一般に、全乳漿はタンパクタッチ残留物を集めるために限外口通によって現在商業的に処理される。限外口通工程からのラクトースリッチ透過物はラクトースおよび/または乳酸を回収するためさらに処理されてきたか、または透過物は乾燥し、そして肥料として使用することができた。本発明はこのラクトースリッチ透過物を他の有用な製品を生成するための処理に関する。

第1図は本発明による一般的过程を示し、その中で全乳漿はラクトースリッチ酪産乳漿透過物を生成するように限外口通にかけられる。透過物の固形分濃度は適当な濃度へ調節され、そしてpHは約3ないし10に調節される。pHの調節は混濁を生成し、これは遠心および/または限外口通によって上清から分離される。溶質分画は後の使用のため場合によりスプレードライすることができ、またはそのまま微生物培地としてそれ以上の処理に使用することができる。混濁分画はそのまま使用、ペーストへ濃縮、または水性もしくは油性液体の乳化またはタンパクの乳化もしくはゲル化のための乳化剤として使用するために乾燥することができる。得られるエマルジョンまたはゲルは所望の最終使用に適当な他の成分と混合することができる。

第2図を参照すると、溶質分画と適当な栄養を補給し、オートクレービングまたは口通によって滅菌することができる。その代わりに、滅菌しない補給した溶質分画は場合により以後の使用まで貯蔵のためスプレー乾燥し、次に使用前オートクレービングまたは口通によって滅菌することができる。滅菌した溶質分画は、非補給または追加の栄養を補給したにせよ、液体または固体培地として次に使用することができる。もし固体培地を望むならば、固体培地を形成

および膜の特定のタイプは重要でないように見える。何故ならば、商業的に入手し得る Abcor (セルロースおよび非セルロースチューブ状膜)、DDS (De Danske Sukkerfabrikker, ポリスルホンおよびセルロース平膜)、Dorr-Oliver (ポリスルホンおよびセルロース接着プレート膜)、および Ladish (ポリスルホンおよびセルロースらせん巻膜) 限外口通装置で口通したWLP製剤から比肩し得る成績が得られたからである。膜は一般に一次透過物のための分子量カットオフ約17ないし20 kdal (キログダルトン)を持っているので、使用する膜は、最終製品の品質がそのような物質で損なわれるのでタンパククリークを生ずるピンホール効果を持っていないことが重要である。そのような限外口通膜のための慣用の作業条件はpH 0-14、温度約3.8-80℃、および圧力約60-145 psi である。

スプレー乾燥した形、または全固形分5-40% (wt/vol) の濃度で液体液に得られたWLP出発原料は水で溶解または希釈され、または固形分2-20%、好ましくは約18%の固形分含量へ濃縮される。この範囲より大きく低い濃度は培地製品として使用するのに不適切な栄養含量を有する液相を得ることができ(酸性WLPは甘いWLPよりも同化窒素源の高い含量を持つように見えるが)、この範囲より大きく高い濃度は操作中溶液に滞留し得ないであろう。固形分20-25%以上の濃度に高い濃度もオートクレービング時沈澱するWLP成分の除去を妨害する。

ここでは総括して微結晶混濁分画と呼ぶこれら成分は、混濁物質を沈澱するようにそのpHを上げることによってWLP溶液から沈澱する。これは一般に十分な無毒性ルイス塩基、好ましくは無阻塩基、例えばアルカリ金属水酸化物および特に水酸化アンモニウム(

これは好ましくは比較的低毒性アンモニウムイオンを生成するように希釈したWLPへアンモニアガスを泡立てることによってその場で発生させる)を添加することにより、希釈したWLPのpHを約8-10へ、好ましくは約pH9へ上げることによって達成される。透過物のpHを調節するのに使用される物質は、それが毒性ある物質でない、もしくはそれを生成しない限り重要でないように見える。本発明による製品は食品生産物、医薬品、化粧品および微生物生育のための培地として使用し得るので、従ってそのような使用に対するpH調節剤は動物および微生物に無毒な物質に限定される。前記のようなpHの調節により、微結晶性沈澱が生成する。沈澱工程が実施される温度は特に重要でない。便利には20-50℃の範囲が使用し得る。

希釈したWLPのpHのこの上昇は微結晶性沈澱の沈澱を生じ、最適収率は通常約pH9で得られる。沈澱分離の全部の除去のための最適pHは、そのpHを8-10の範囲内の選んだ値へ上昇した後WLP溶液の部分濃度をオートクレーピングし、このようにして生成した沈澱分画を分離することによって決定することができる。もし低または高過ぎるpHを使用すれば、後の溶質分画のオートクレーピングに際し混濁したおよび/または暗褐色した溶液が得られる。

沈澱は、例えば11,750Gにおける遠心および0.45μ孔径膜を通す口通により、または20-100kda1、一般には10-50kda1そして好ましくは20kda1の分子量排除膜を通す限外口通によって培地から物理的に分離され、そして以下に議論するように乳化または懸濁剤として使用するために保存される。後から口通なしの遠心

単独は一般に不満足である。何故ならば、清澄な上清はしばしば後からのオートクレーピングに際し混濁へ転じ、それによりその培地としての利用性を制限するからである。例えば10kda1の一層小さい孔径膜を通す限外口通は、20kda1またはそれより大きい孔径膜を通して口通したものに比較して、得られた培地が悪い生育を生ずるから不満足である。混濁分画は乾燥し、以下に記載する各種用途において乳化またはゲル化剤として使用することができる。

溶質分画はオートクレープ中で滅菌または滅菌口通(好ましくは約6.8-7.1のpH範囲において)にかけ、そして微生物の生育のための培地として使用することができる。溶質分画は、糖源ラクトース、スクロース、ガラクトースおよびグルコースを含む、同化し得る炭素、窒素、リンおよび他の栄養の有用量を含有する。主な炭素源は出発WLPに存在するラクトースである。補給しない固形分3.5%の121℃/15psiオートクレーピング後の利用可能な糖について、典型的な組成は、A-ラクトース53.0%(11.8mg/ml); α-ラクトース+スクロース44.8%(9.97mg/ml); ガラクトース1.2%(0.27mg/ml); およびグルコース1.0%(0.23mg/ml)である。

WLPは実質上タンパク不含有であるが、一般にアミノ酸および低分子量ポリペプチドの形の代謝産物の適正量を含有する。このため本発明によれば、U.S.S.R.特許819,166に記載されているように、同化し得る炭素含量を増加するため分離されたタンパクを加水分解する必要はない。どの場合でも、大部分のタンパクは限外口通プロセス中に既に除去されており、WLP出発原料の成分として利用できない。もし炭素源の補給を望むならば、それはイースト抽出物お

よびカゼインおよび大豆のような普通に入手し得る動物および植物タンパクのペプトンを含む、普通の炭素源の添加によって達成される。グルコースのような他の糖源、そして緩衝剤、補因子等も選択した微生物の生育をサポートするために必要に応じ添加し得る。微生物培養の技術分野の当業者は、特定の所望の微生物の生育に必要な栄養補給、緩衝剤(すなわち生物がその中で生存するのに最適pH範囲へ)その他を容易に決定することができる。

本発明の溶質分画は、工業的スケールのプロセスに、そして臨床診断テスト方法に有用な各種の微生物培地製造の出発原料として有用である。通常ラクトースを代謝しない微生物に使用のため、またはそのような生物に遭遇するかも知れない臨床的スクリーニング応用に使用するため、培地の代謝可能炭素含量は、総濃度約0.5mg/mlへ一般にグルコースを添加することによって増加することができる。

溶質分画は、固体または液体臨床グレード培地、液体または好気性培地、液体または固体嫌気性培地、一般的工業的醗酵培地、抗生物質製造のための醗酵培地、チーズ製造のための培地その他を製造するために使用することができる。

本発明による例示的な有用な一般目的好気的培地は、以下の比率でイースト抽出物、アミノ酸およびグルコースを補給した水性組成物よりなる。

- 3.5%固形分の清澄化溶質分画
- イースト抽出物(アンバー510)0.05%
- アミノ酸混合物(U.S. Biochemicals)0.5%
- グルコース(USP級)0.05%

上記補給した培地は、以下の表1に示すように通常の栄養プロセスよりも低いタンパク分析(ロウリータンパク含量)を有し、そのため本発明による補給した培地が微生物の生育をサポートするのに有用であろうとは予測されなかった。典型的なアミノ酸分析は表2に示されている。表1ないし4に示されているデータは、カゼインアミノ酸0.5%、イースト抽出物0.05%およびグルコース0.05%を補給した実施例1の一般目的微生物培地の代表である。

表 1  
ロウリータンパク分析

培地	mg/mlタンパク
BBL 栄養プロセス	4.8
Difco Penassay プロセス	3.8
補給したWLP培地	1.2
スキムミルク	30.0

前記補給した溶質分画の以下のアミノ酸分析から、それは微生物の生育を支持するアミノ酸の適切な範囲を含有することが見られる。しかしながら、与えられたアミノ酸を生産するための遺伝子メカニズムが欠けている微生物の生育に必要なとされるような、特定のアミノ酸の通常でない量を特定の応用が必要な場合、培地はそれに応じて補強し得る。

(以下余白)

表 2

## 増強したWLP 培地の典型的アミノ酸分析

アミノ酸	大体のμモル/μl
アラニン	3.89
アルギニン	1.05
アスパラギン酸	2.63
グルタミン酸	9.54
グリシン	1.91
ヒスチジン	0.93
イソロイシン	1.88
ロイシン	3.38
リジン	3.09
メチオニン	1.08
フェニルアラニン	1.46
セリン	4.56
スレオニン	1.90
バリン	3.45

増強したWLP 培地は、表3および4に示すように酸性および塩基性添加に対して良好な緩衝能力を示す。これは大部分の微生物は限られたpH範囲内のみ生存し、そしてこの増強した溶質分画は緩衝剤の添加なしに慣用の栄養ブロスに比肩し得る緩衝能力を示すので、予期しないそして有利な性質である。

(以下余白)

栄養ブロスに有利に比肩する。

2) 一次臨床標本から好気性および嫌気性微生物の培養のための一次分画培地(PIM)。この材料はしばしばカゼインアミノ酸0.25-0.5%, イースト抽出物0.5%, グルコース0.4-0.5%, 寒天または酸素拡散を減らす他のゲル化剤0.1%, および還元剤としてシステインHCl 0.05%で増強される。酸素含量を減らすため使用前煮沸する時、得られる臨床グレード培地は広く使用されているチオグリコレートブロスに有利に比肩し得る。

3) 条件および偏性嫌気性微生物培養のためのあらかじめ還元した無菌の嫌氣的に製造した培地。それは好ましくはカゼインアミノ酸0.25-0.5%, イースト抽出物1%, そして酸化還元指示薬としてレザズリン0.001%で増強される。後者の培地は真空雰囲気中で約10分間煮沸され、そしてシステインHCl 0.2%, ヘミン0.50mg/ml, ビタミンK<sub>1</sub> 1mg/mlで増強され、そして真空雰囲気中で貯蔵する前に水酸化アンモニウムでpH 7.8へ調節される。あらかじめ還元された寒天培地の試験管を調製するため、最初寒天を所望の最終濃度を与えるように試験管へ加え、そして試験管中の寒天へあらかじめ還元したブロス培地を加える。121℃/15psiにおいて20分間オートクレービング後、残りの固体寒天を試験管を数回回転することによって溶解した。この培地は-150mVまたはそれ以下の酸化還元電位を有し、培地の酸化によって比色定量レドックス指示薬はピンクへ転ずる。

4) 例えば固形分3.5%へ希釈した溶質分画を含有し、そしてAmber 510 ビール酵母抽出物約0.25%で増強した液体または固形形の工業用醗酵培地。固体培地のため、慣用のゲル化剤、例えば寒天約1.

表 3

## 酸緩衝能力

ブロス2.5mlへ1N HClの連続的0.1ml添加後のpH

培地	0	1	2	3	4	5
Difco Penassayブロス	6.92	6.84	6.34	5.96	5.28	4.37
WLP 培地 (増強)	6.82	5.59	4.66	4.14	3.73	3.32
BBL 栄養ブロス	6.80	4.38	3.58	3.04	2.80	2.31

表 4

## 塩基緩衝能力

ブロス2.5mlへ1N NaOHの連続的0.1ml添加後のpH

培地	0	1	2	3	4	5
Difco Penassayブロス	6.93	6.93	6.96	6.99	7.02	7.05
WLP 培地 (増強)	6.80	6.93	7.04	7.17	7.31	7.45
BBL 栄養ブロス	6.74	6.89	7.19	7.37	7.55	7.71

増強したWLP 培地は液体形に製造するか、または好ましくはより大きい貯蔵安定性のため10重量%以下、例えば約6重量%の水分含量へスプレー乾燥することができる。液体ブロスを製造する時、121℃で15-20分間オートクレービングする前に任意の所望の増強剤を添加することができる。この態様において、各種タイプの培地を基本の増強しないWLP 溶質分画から容易に製造することができる。現在好ましい培地は以下のとおりである。

1) カゼインアミノ酸約0.25-0.5%, イースト抽出物0.05%, およびグルコース0.05%で好ましくは増強した溶質相の一般目的生育培地。これは広く使用されている一般栄養ブロス、例えばDifco Penassayブロス、Oxoid Lablescoブロス、栄養ブロスNo 2およびBBL

5%を添加することができる。そのような工業的醗酵培地の典型的分析は以下のとおりである。

## 典型的分析

タンパク、キールダール (%N×6.32)	12.10
タンパク、ロウリー	3.5
脂肪%	<1.0
灰分%	<1.0
炭水化物%	81.5
水分%	6.5
かさ密度, g/cc	0.63
水中溶解度, g/100ml, 30℃	24.5

## 糖プロファイル (%)

ガラクトース	0.8
グルコース	0.7
ラクトース	81.5
スクロース	微量

## アミノ酸プロファイル (mg/100g)

アルギニン	160
シスチン	30
グルタミン酸	380
グリシン	230
ヒスチジン	100
イソロイシン	190
ロイシン	270
リジン	270

メチオニン	90
フェニルアラニン	180
スレオニン	150
トリプトファン	40
チロシン	170
バリン	180
<u>ビタミン類 (mg/100g)</u>	
B <sub>1</sub>	0.30
B <sub>2</sub>	16.60
ナイアシン	21.70
<u>微量ミネラル (mg/100g)</u>	
アルミニウム	< 0.906
バリウム	0.121
ホウ酸	0.242
カルシウム	26.21
クロム	< 0.121
銅	< 0.181
鉄	0.181
マグネシウム	34.97
マンガン	0.060
リン	341.56
ナトリウム	580.14
ストロンチウム	0.785
亜鉛	0.640

微生物  
CFU 220/g  
大腸菌群 陰性

粒子寸法  
85%がタイラー200スクリーンを通過する。

オートクレーブ後のpH  
6.5 (全固形分3%)

上に記載した工業用菌種処方は以下の工業的に重要な生物の生育を支持する。

*Streptomyces griseus* ストレプトマイシン (検出可能レベル24時間以内) およびプロナーゼ生産

*Penicillium notatum* ペニシリン (検出可能レベル24時間以内) 生産

*Saccharomyces cerevisiae* エタノール生産

*Aspergillus niger* クエン酸生産

5) 増加したグルコース含量を持つ工業用菌種培地。そのような培地の一つは、2.0%固形分へ希釈した溶質分画よりなり、Amber510イースト抽出物0.25%とデキストロース1.0%で補強される。他のそのような培地は、固定化ラクトースリアクターを通過させ、固形分3.0%へ希釈し、そしてAmber510イースト抽出物0.25%を補強した溶質分画よりなる。リアクター中の溶質分画の滞留時間は、この培地の最終デキストロース濃度を制御するpHおよび反応温度と組合わせて使用される。

それ故、溶質分画は補強または補強しない形で、ストレプトマイシンおよびペニシリンのような抗生物質の生産に使用することがで

きる。さらに、本発明による溶質分画は、硬質または軟質チーズの生物学的生産のような、スターター培養生育培地として使用することができる。

いくつかの工業的菌種プロセスに使用するためには比較的重要でないが、臨床的应用においてはブロス培地の光学的清澄性は高度に重要である。この目的のため、いくつかの場合にはあるサンプルは望ましい透明な製品を与えないことが発見され、使用しようとする補強剤のサンプルをスクリーンすることが望ましい。約1%の高いイースト抽出物濃度において、Amber Laboratories, Inc. から得たAmber 510 水溶性自己分解イースト抽出物と、そして Becton, Dickinson and Co. の BBL微生物部門から得たネッスルイースト抽出物は満足であると証明された。Difco Laboratories, Inc., U.S. Biochemical Corp. および Marcor Development Corp. からのアミノ酸補給体も同様にこのプロセスに使用のために満足である。

液体培地として使用するため、本発明のプロセスによって得られた溶質分画は無菌ろ過またはオートクレービングのような慣用方法によって滅菌し得る。一旦オートクレーブすれば、無菌培地の微生物生育能力が減るから無菌培地は再オートクレーブしてはならない。もし無菌ろ過単独を一般に0.22μフィルターを通して使用するならば、ブロスのpHをHClのような適当な無毒性酸の添加によって約6.8-7.7へ減らすことが必要である。これはろ過の前または後で実施することができるが、しかしこの場合でも使用前でなければならぬ。オートクレービングによる液体培地の滅菌は、そのpHを約9から望ましい範囲へ必然的に減少させることが発見され、そしてこの理由のためpH9への当初のpH調節とオートクレービング

が現在好ましい。この理由は完全には知られていないが、しかし培地のポリペプチドまたは他の有機緩衝化成分がオートクレービングの熱によって分解される結果かも知れない。

ブロスとしてのその使用に加え、本発明の基本的未補強溶質相は、公知技術によって寒天、カラゲラン、ペクチン、シリコーンゲル、グアーガム、ローカストビーンガム、各種ゲル化ポリサッカライド等のようなゲル化剤の添加により、固体もしくは半固体プレートまたは斜面試験管に調製することができる。これらゲル化剤は、血液寒天、プロテアーゼアッセイ寒天、リトマス寒天等として使用するために適した培地を作るため、豚フィブリンヒジもしくはウマ血液、タンパク、リトマス等のような他の添加剤を用いまたは用いずに使用できる。例えば、液体培地は寒天1.5% (wt/vol) の添加によって注加プレートの形に容器に調製される。一般に、本発明の未補強溶質培地はその最終意図用途に応じて各種の補強剤を添加することによって所望により修飾することができる。例えば、アメリカン、タイプ、カルチャー、コレクションのストレインIのカタログ15版(1982年)の培地部分601-656頁を見よ。

その代わりに、溶質分画は貯蔵寿命を増し、そして輸送費を節約するため粉末ヘスプレー乾燥することができる。溶質分画はスプレー乾燥のため濃縮された形でなければならないので、一般に液体培地に採用される3.5%より高い濃度にあるWLP出発原料の使用が好ましく、そして20%もの高濃度が満足であることが証明された。WLP出発原料の固形分含量が30%へ近付くとき、固体物質の一部が懸濁液中に残り、pH調節によって沈澱しないことがあることが発見された。イースト抽出物0.05%および/またはカゼインア

ミノ酸0.25-0.5%のような増強剤を含有する培地のスプレー乾燥は容易に達成される。増強剤成分のスプレー乾燥は一般に、その上で材料の残りが乾燥できる急速に乾燥して灰をつくる懸濁液中の増強剤の不含有を補償するための乾燥機空気を必要とする。

Niro Atomizer, Inc. によって製造したもののようなポータブル一般目的スプレードライヤーは、約200℃の温度および出口物質温度約80℃のとき全く満足である。そのような条件を使用し、基本の増強剤培地中の水分は約6%減らされる。

本発明の培地は抗生物質、酵素、有機酸、アルコール類、およびケトン類の菌生産に使用でき、そしてまたアメリカン、スイス、イタリアン、チエダー、モザレラおよびコテージチーズのような硬質および軟質チーズの生物学的製造にスターター培養物生育培地として使用できることが認められるであろう。これらWLP培地は、特に G.W. Reinbold et al 米国特許 3,998,700; D.L. Anderson et al の同 4,020,185; R.S. Porubcan et al、同 4,115,199および W.B. Sandine et al、同 4,282,255に記載されている全乳漿系チーズスターター培養物と明らかに異なる。

アルカリ性 pH、好ましくは約 pH 9 において沈澱し、そして培地から遠心または20-100 kdal 膜を通して限外ろ過することによって分離された微結晶混濁分画は、4℃でショートニングの稠度を有しそして室温へ加温する時もっとも自由流動性となる水性ベレット物質として得られる。乾燥する時、この沈澱は無味、無臭、灰白色自由流動性粉末であり、典型的には処理したWLP固形分仕込みの約15%がこの乾燥した沈澱粉末として回収される。

この沈澱は他の研究者によって報告された乳漿透過物と性質が異

なる。米国特許 4,143,174および 4,209,503に Shah et al が報告している外見上似ている物質とは異なり、本発明の微結晶混濁分画は表5によって示すように石油エーテルに不溶である。本発明の微結晶混濁分画の物理的特性は沈澱がそれで回収される形に決定的に依存する。温度液として回収する時、それは水中でゲルを生成し、そして石油エーテルと不混和性である。ペースト形へさらに濃縮する時、微結晶混濁分画は水および石油エーテルに不溶となる。例えば6%水分へ一旦乾燥すると、微結晶混濁分画は水に過渡的に混濁し得るだけであるが、しかしなお石油エーテルに不溶である。

表 5

## 混濁分画の溶解性

溶媒	溶解性
<u>濃縮混濁分画ベレット</u>	
酢酸エチル	不溶、非分散ペースト
ベンゼン	同上
トルエン	同上
クロロホルム	同上
石油エーテル	同上
メタノール	非常に混濁した懸濁液
エタノール	同上
プロパノール	同上
ブタノール	少し混濁
1N HCl	混濁懸濁液
1N NaOH	同上

## 乾燥混濁分画

水、固体5%	少し混濁
水、固体10%	同上
水、固体20%	同上
石油エーテル、固体5%	不溶性粒子
石油エーテル、固体10%	同上
石油エーテル、固体20%	同上

IPC分析により化学分析する時、本発明の微結晶混濁分画は、表6に示すように、処理しないスプレー乾燥したWLPおよびWLPを20%濃度(wt/vol)へ再懸濁しそして4℃において72時間冷却する時生成する沈澱とその性質において明らかに異なる。示したデータは、室温で約20%の最大水溶解度と、その濃度で5.5ないし6.0の通常pHを持ち、炭水化物1g/100g未滴を含み、実質上タンパクおよび脂肪を含まない同じ出発原料サンプルからのものである。データは、アメリカン、オーガニゼーション、オブ、アナリチカル、ケミストの Industrially Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy Method 3.005 に従ったIPC分析によって得られ、そして140°ないし150°下への加熱を含む Pederson の米国特許 4,202,909の方法に従って製造したサンプルと比較した。すべてのサンプルは、個々の処理前にスプレー乾燥WLPを水中に20%(wt/vol)再懸濁することにより調製した。

(以下余白)

表 6

## 混濁分画のIPC分析

mg/100g 固体(乾燥基準)

	スプレー 乾燥WLP	アルカリ 性pH沈澱	冷時沈澱4 ℃72時間	Pederson 沈澱, 78℃
カルシウム	348-438	5392	15800	7934
鉄	0.11-0.12	6.65	6.59	4.77
リン	488-491	782.8	11448	4075
マグネシウム	150	5733	2370	548.2
亜鉛	0.06-0.08	0.79	3.42	1.39
銅	0.025	0.75	0.79	0.37
ナトリウム	774-863	481.6	718	600.9
クロム	0.036-0.037	0.48	1.57	0.50
アルミニウム	1.1-1.3	52.96	15.68	6.50
バリウム	0.025-0.028	0.82	0.57	0.57
ストロンチウム	0.11-0.22	1.54	6.60	3.74
ホウ素	0.06-0.07	3.70	0.631	0.38
マンガン	0.005-0.11	0.21	0.21	0.18

本発明に従って製造した出発原料の各種ソースから製造した微結晶混濁分画についてpHの関数としてのゼータ電位を測定することにより、安定なエマルジョンまたはコロイドが生成できる適当なpH範囲が決定できる。電荷ゼロポイントは懸濁液中の物質が少なくとも不安定であるpHに相当するので(タンパクの等電点すなわちIPとは異なる)。少なくとも約5mVのゼータ電位を与えるpH値が一般に好ましく、電荷ゼロポイントからの偏差が大きい程



最大の安定性が得られる。しかしながら酸性液では、そのような高酸度は微結晶混濁分画中に存在するポリペプチド成分の分解を生じ得る。

これら独特の溶解性を考慮に入れ、本発明の空気乾燥した微結晶混濁分画は、例えば医薬品化粧品および食品材料の食品級乳化剤または懸濁剤として、この分野で既知の技術を使用して広範囲の工業用途に使用することができる。

これ以上熟考することなく、この分野の当業者は、以上の説明を使用して本発明をその最大限度利用することができるものと信じられる。従って以下の好ましい実施例は単に例証であり、記載の他の部分の限定と解すべきではない。以下の実施例において、温度はここのない限り未補正摂氏で表し、すべての部および%は重量による。

#### 実施例 1

##### 溶液分画および混濁分画の製造

WLP 7 g (Express Foods Co. から得たもので、Foremost McKesson, Inc. および他のソースから商業的に入手し得る製品に類似) を脱イオン水で 200 ml (固形分 3.5 wt/vol %) とした。もし混合物をかきまぜなければいくらかの固体は溶液から落下しようとするので、混合物を数分間かきまぜてよく混合した。pH を最初の pH 6.09 から 5.5 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  2.15 ml をかきまぜながら添加することによって 8.99 へ上げ、4℃で冷却した GSA ローターを用いて Sorvall RC-58 遠心機中 8500 rpm (11,800 G) において 10 分間遠心した。出発溶液 100 ml 当たり 1.26 g の軟らかい白色微結晶混濁分画ベレットが得られた。上清は 0.45 μ, 115 ml

Malgene ロ過ユニットを通して注ぎ、pH 9.04 を持つ透明物質 200 ml を得た。121℃/15 psi で 20 分間オートクレービング後、にぶいオレンジ色の透明な最終 pH 7.07 を持つ未補強培地が得られた。

対照として、全乳漿を出発原料として用いて上の操作を繰り返した。最初の pH は 6.26 で、 $\text{NH}_4\text{OH}$  2.4 ml を加えて pH を 8.98 へ上げた。遠心後、出発物質 100 ml 当たり 1.08 g の硬い黄褐色ベレットが得られた。上清は透明でなく、全体に綿毛状物質が浮遊していた。上清の約 25 ml のみがそれが目詰りし、交換を要するまでにフィルターユニットを通過した。ロ過後、上清はなお混濁しており、pH 8.98 を持っていた。オートクレービング後、にぶいオレンジ色の pH 7.08 を持つ混濁液が得られた。

#### 実施例 2

##### 酸性(サワー)酪乳漿溶液分画から補強した培地の製造

実施例 1 の操作に従って、Giant Food, Inc. のメリーランド州ランハム乳製品向上においてコテージチーズ製造から得た、当初 pH 4.45 を持つ酸性乳漿から微生物培地を製造した。全酸性乳漿を 30 kdal Dorr-Oliver フィルターユニットを通して限外ロ過し、一次残留物および一次透過物を得た。一次透過物を  $\text{NH}_4\text{OH}$  で pH 9 に調節し、そして限外ロ過プロセスを繰り返して二次微結晶混濁分画および二次透過物を得た。二次透過物をカゼインアミノ酸 0.25%, イースト抽出物 0.05% およびグルコース 0.05% で補強し、121℃/15 psi で 20 分間オートクレービングした。得られたオートクレーブした培地は透明で黄金色であり、pH 8.15 を持っていた。

#### 実施例 3

##### 他の塩基による製造

pH 調節するため KOH を使用した以外、実施例 1 の操作を繰り返した。当初 pH 6.09 から pH 8.92 へ上げるため 6 N KOH 0.2 ml および 1 N KOH 0.2 ml を添加した。出発物質 100 ml 当たり 1.66 g の混濁分画が得られた。ロ過後、上清は透明で、pH 8.78 を持っていた。オートクレービング後、液は金色で、そして非常にわずかに混濁しており、pH 6.25 を持っていた。

実施例 1 の操作において  $\text{NH}_4\text{OH}$  を  $\text{NaOH}$  に代えた時、最初の pH 6.08 は 3 N  $\text{NaOH}$  0.45 ml の添加により pH 8.90 へ上昇した。遠心は、出発原料 100 ml 当たり 1.62 g の微結晶混濁分画を軟らかい白色ベレットとして与えた。0.45 μ 膜を遠す限外ロ過後、上清は透明でして pH 8.75 を持っていた。オートクレービング後、最終 pH 6.25 を持つ金色の少し混濁した液が得られた。

#### 実施例 4

##### 比較生育特性

実施例 1 および 3 からのオートクレーブした透明培地を普通の実験室培養株 *Bacillus subtilis* 6051a, *Enterobacter aerogenes* E13048, および *E. coli* HS の生育を支持するそれらの能力について評価した。未補強の、そして BBL イースト抽出物 1%, Difco カゼインアミノ酸 0.5%, スクロース (Sigma Chemical Co.) 0.5% を補強した培地の試験管を接種し、35℃で 5 時間インキュベートし、その後 660 nm において光学密度読みを見た。対照として Difco Penassay ブロスおよび BBL 栄養ブロスを用いた。このおよび以後の実験は、測定した光学密度における半対数差に大体相関する以下

のスケールにより評価した。

+++	すぐれた生育	: 0.0, 0.3 - 1.0
++	良好生育	: 0.0, 0.1 - 0.3
+	中程度生育	: 0.0, 0.03 - 0.1
+	わずかな生育	: 0.0, 0.005 - 0.03
-	生育なし	: 0.0, 0 - 0.005

表 7

##### 予備生育スクリーニング

培地	<i>E. subtilis</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>
Difco Penassay ブロス	+++	+++	+++
BBL 栄養ブロス	+++	+++	+++
3.5 % WLP* ( $\text{NaOH}$ )	++	++	++
3.5 % WLP* ( $\text{NaOH}$ ) + 補強	+++	+++	+++
3.5 % WLP* ( $\text{KOH}$ )	++	++	++
3.5 % WLP* ( $\text{KOH}$ ) + 補強	+++	+++	+++
3.5 % WLP* ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )	++	++	++
3.5 % WLP* ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) + 補強	+++	+++	+++

\* WLP 固体として

#### 実施例 5

##### pH の重要性評価

微結晶混濁分画の沈降のために使用する pH の重要性を評価するため、実施例 2 におけるように補強した一連の培地を調製し、その中で当初の pH を必要に応じて  $\text{HCl}$  または  $\text{NH}_4\text{OH}$  を使用して pH 4 ないし 11 の間に調節した。当初 pH を除き、培地は実施例 1 と同様

に調製し、そしてオートクレーブ前に補強剤を添加した。その時サンプルのすべては同じように見え、容易に口過された。オートクレービング後得られた製品の差を表8に示す。

表 8

処理 pH	オートクレービング後の外観	オートクレービング後 pH
4. HCl	透明、ライトグリーン	4.5
5. HCl	透明、ライトグリーン	5.5
6. 無添加	少し不透明	6.0
7. NaOH	非常に混濁、明黄色	6.1
8. NaOH	非常に混濁、金色	6.4
9. NaOH	透明、ルートビール色	7.1
10. NaOH	非常に暗褐色	8.8
11. NaOH	液体チョコレート様	9.7

## 実施例 6

## 代表的発育曲線

実施例4の操作に従い、実施例1の操作によって製造した乳製透過物培地へカゼインアミノ酸0.25%およびイースト抽出物0.05%を補強し、それへ0.05%グルコース添加および不添加したものをDifco PenassayプロスおよびBBL栄養プロスト、臨床的に重要な微生物の代表的種類の発育を支持する能力について比較した。結果を表9に提供し、そして本発明の培養相培地は現在広く普及している工業的標準品に有利に匹敵することを示す。

(以下余白)

## 実施例 7

## 発育に対するオートクレービングの影響

オートクレービングによって最終製品中に中性pHを得ることの重要性を評価するため、口過滅菌したグルコース補強培地対照を、オートクレーブ処理の代わりにHClの添加によって最終pHをpH7へ調節したことを除いて実施例6で用いた培地に他の点では対応して調製した。結果を表10に示す。

(以下余白)

表 9  
液体培地中の代表的発育

微生物	乳製透過物 培養(補強) グルコース	乳製透過物 培養(補強) グルコース	乳製透過物 培養(補強) グルコース	乳製透過物 培養(補強) グルコース	乳製透過物 培養(補強) グルコース
Bacillus subtilis 6051a	+++	+++	+++	+++	+++
Escherichia coli NS	+++	+++	+++	+++	+++
Enterobacter aerogenes E13048	+++	+++	+++	+++	+++
Streptococcus faecalis E19433	+++	+++	+++	+++	+++
Staphylococcus aureus 6538P	+++	+++	+++	+++	+++
Proteus mirabilis 25933	+++	+++	+++	+++	+++
Klebsiella pneumoniae 23357	+++	+++	+++	+++	+++
Pseudomonas fluorescens 15453	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhimurium LT2	+++	+++	+++	+++	+++
Shigella sonnei	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhimurium 21a	+++	+++	+++	+++	+++

表 10  
液体培地中の代表的発育

微生物	オートクレーブ 処理した乳製透過 培養(補強) グルコース	オートクレーブ 処理した乳製透過 培養(補強) グルコース	オートクレーブ 処理した乳製透過 培養(補強) グルコース	オートクレーブ 処理した乳製透過 培養(補強) グルコース	オートクレーブ 処理した乳製透過 培養(補強) グルコース
Bacillus subtilis 6051a	+++	+++	+++	+++	+++
Escherichia coli NS	+++	+++	+++	+++	+++
Enterobacter aerogenes E13048	+++	+++	+++	+++	+++
Streptococcus faecalis E19433	+++	+++	+++	+++	+++
Staphylococcus aureus 6538P	+++	+++	+++	+++	+++
Proteus mirabilis 25933	+++	+++	+++	+++	+++
Klebsiella pneumoniae 23357	+++	+++	+++	+++	+++
Pseudomonas fluorescens 15453	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhimurium LT2	+++	+++	+++	+++	+++
Shigella sonnei	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhimurium 21a	+++	+++	+++	+++	+++

上の表の最後の項から、*Salmonella typhimurium*の発育には、オートクレーブ処理によって変化しないがしかしろ過滅菌した培地は、どは容易に代謝されないようになる必要のある栄養が明らかに存在する。それにもかかわらず、オートクレーブした、およびろ過滅菌した培地の両方は栄養ブロス対照よりすぐれていた。

#### 実施例 8

##### 嫌気性培地の製造

L.V. Holdeman et al. (Ed.) の *Anaerobe Laboratory Manual* 第4版 (1977) の操作に従って、使用直前に乾燥成分カゼインアミノ酸 0.5%, イースト抽出物 1%, デキストロース 0.5% を秤取し、水およびレザズリンを添加し、窒素ふん囲気中加熱することによってあらかじめ還元した嫌気性培地を製造した。溶液をレザズリンが青からピンクないし無色へ 5-10 分で変色するまでゆるやかに煮沸した。これは酸化されたシステインはある嫌気性菌には有毒であり得るので、システインの酸化を防止するために煮沸によって培地の部分還元後に行った。液へ窒素を吹き込みながら試験紙によって測定して pH を 7.8 へ  $\text{NH}_4\text{OH}$  で調節し、次に窒素で逆流した試験管へ分配した。あらかじめ還元した寒天培地の試験管を調製するため、試験管へ最初寒天を所望濃度を与えるように添加し、そして試験管内の寒天へあらかじめ還元したブロス培地を加えた。121°C / 15 psi において 20 分間オートクレービング後、残りの固体寒天を試験管を数回反転して溶解した。

#### 実施例 9

##### 嫌気性培地中の代表的発育

液体嫌気性培地を細菌の 3 株に対して嫌気性発育を支持するその

たオートクレーブした培地は僅かに混濁しているのみで、金色で、そして pH 6.71 をもっていた。もし透明な培地を望むならば、Amber BYF100 の代わりに Amberex500 イースト抽出物のような易溶性イースト抽出物を代わりに用いる。

#### 実施例 11

##### 工業的固酵プロセス

テキサス州ブラウンズビルの合衆国農務省棉研究所の Dr. Howard T. DuImage から入手した *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis*, var. *Berliner* を、DuImage et al., J. Invert. Pathol. 22: 273-277 (1973) に記載の方法を使って、工業的固酵プロセスを支持する本発明の培地の能力を例証するために選定した。この生物は  $\delta$ -エンドトキシンを生産し、そして毒蛾害虫の制御に生物学的殺虫剤として、例えばイリノイ州シカゴのアボット、ラボラトリーズから商標 DIPEL 4L の名称で入手し得る幼虫キラーとして使用される。Bacillus thuringiensis のバロ孢子および胞子の発達を Applied Microbiology 18(4): 490-455 (1969) に記載された L. A. Bulla et al. の方法に従って位相差顕微鏡のもとにモニターした。

Bulla et al. 記載の GYS 培地および DuImage et al. 記載の B4, B4b および B8b 培地と比較して、Amber BYF100 を 0.25% 含む実施例 10 の修正培地中の胞子形成の程度を比較するため、70°C における熱ショックを使用した。熱抵抗を完全胞子形成の測定として使用した。

24 時間後、本発明の培地では胞子形成がその最高レベルへ近づくが、GY S 培地での胞子形成は 48 時間まで最高レベルに達せず、加えて得られた最高胞子形成は GYS よりも 100 倍高かった。

能力について試験した。イースト抽出物 0.05% およびグルコース 0.05% を含むサンプル (培地 1) と、イースト抽出物 1.0% およびグルコース 0.5% を含むサンプル (培地 2, 実施例 8 から) へ嫌気性微生物を接種した。Difco 脳心臓注入ブロス (BHI) を第 1 の対照培地として使用、トリプトン 1%, イースト抽出物 2%, グルコース 2% を含む培地 (TYG) を第 2 の対照として用いた。インキュベーションの最初の 8 時間の間に光学密度読みを行った。結果を以下の表に要約する。

表 11

##### 嫌気性生育スクリーニング

微生物	BHIブロス	TYGブロス	培地 1	培地 2
Bacteriodes	+++	+++	+++	+++
uniformis V622				
Bacteriodes	+++	+++	+++	+++
fragilis				
ATCC 25285				
Bacteriodes	+++	+++	+++	+++
fragilis 479-1				

#### 実施例 10

##### 工業的固酵のための基本的培地の製造

3.5% WLP (wt/vol, Foremost-McKesson, Inc. または Express Foods Co. より商業的に入手可能) を  $\text{NH}_4\text{OH}$  で pH 9 へ調節し、30 kdal Dorr-Oliver フィルターユニットを通して限外ろ過した。透過物を 121°C / 15 psi において 20 分間オートクレーブ処理する前に、Amber BYF100 イースト抽出物 0.25% で補強した。得られ

本発明の培地を B4, B4b および B8b と比較する同様な実験は、前者では 24 時間後の胞子形成が 10 ないし 100 倍高く、加えて、得られた最高胞子形成レベルは 5 ないし 10 倍高かった。

#### 実施例 12

##### 工業的固酵培地

実施例 1 の基本培地をオートクレービング前に BFY 100 イースト抽出物 0.251% で補強した。得られる培地の部分標本を工業的に興味ある数種の生物で接種した。コロニー形態および乾燥菌体重量収量を記録し、表 12 に示した。この実験は、本発明培地は工業的固酵プロセスに使用できることを示す。

表 12

株	コロニー形態	乾燥菌体収量*
Aspergillus	単一、大きい	0.76 g / 100 ml
alger	菌糸マット	
Penicillium	分散、ビード状	0.47 g / 100 ml
notatum	発育	
Streptomyces	よく分散	0.21 g / 100 ml
griseus		
Saccharomyces	よく分散	0.287 g / 100 ml
cerevisiae		

\* 1/10 vol 接種および振とう下 30°C インキュベーション 5 日後

#### 実施例 13

##### 抗生物質製造

補強しない同じ基本培地を 2 種の普通に使用される工業的微生物による抗生物質の製造を示すために使用した。表 13 に報告されて

いる結果は、最適化されていないが薬品生産が有用量で発生したことを示している。

表 13  
抗生物質生産

株	抗生物質	単位/μl *
<i>Penicillium notatum</i>	ペニシリン	0.0064 単位/μl
<i>Streptomyces griseus</i>	ストレプトマイシン	0.00735 単位/μl

\* 1/10vol 接種および25-30℃でかきまぜインキュベーション1日後

#### 実施例14

##### 溶質分画から栄養増強した培地の製造

実施例1で製造した溶質分画をカゼインアミノ酸0.5%、イースト抽出物0.05%およびグルコース0.05%で増強した。プロセスの試験管を種々の微生物で接種し、発育を表14に報告するようにプレートカウントにより、または表15に報告するように肉眼で観察した。

表 14  
発育のプレートカウント観察

試験生物	増強溶質	対照培地 (BHI, PABA, 寒天)
<i>M. meningitidis</i>	80	250
<i>H. influenzae</i>	80	0
<i>B. ovitis</i>	1250	1800

表 15  
発育の肉眼観察

*Sarcina ureae*

#### 2-3日後発育するカビ

*Aspergillus niger*

*Doratomyces stemonitis*

*Penicillium sp.*

#### 実施例15

##### 混濁分画の懸濁および乳化性

3種の微結晶混濁分画サンプルを含むコロイドの安定性をゼータ電位の測定によって測定した。各サンプルは脱イオン水で0.100%懸濁液へ希釈し、ゼータメーター (Zeta-Meter, ニューヨーク州ニューヨーク) を用いて電気泳動度を測定した。この機器において、サンプルの懸濁液を電気泳動セル中へ傾斜し、セル中へ差し込んだ一対の電極間に電位を印加した。格子の2本の線間を水平に粒子が移動する平均時間を顕微鏡により観察し、記録する。この時間を標準変換表を用いてゼータ電位へ変換する。

風乾したExpress Foods 微結晶混濁分画である第1のサンプル懸濁液は中程度に安定であり、固体は15分にわたってゆっくり分散し、一部の大きい粒子はかきまぜを停止する時容器の底へ速やかに沈降する。Express Foods 微結晶混濁分画である第2のサンプル懸濁液はペーストであり、極めて安定であったが、PGA-1微結晶混濁分画である第3のサンプルも極めて安定であるように見えたがしかしそのゼータ電位測定前に24時間かきまぜた。

ゼータ電位に対するpHの影響を3種の物質のめいめいについて決定した。各サンプルのゼータ電位は中性pH範囲において陰性であり、そして塩基性が増すにつれもっと陰性になり、そして酸

#### 30℃において24時間以内に発育

*Alcaligenes faecalis*  
*Bacillus cereus*  
*B. megaterium*  
*B. subtilis*  
*Citrobacter freundii*  
*Enterobacter aerogenes*  
*Escherichia coli*  
*Micrococcus luteus*  
*Proteus vulgaris*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*P. elongata*  
*Rhodospirillum rubrum*  
*Salmonella typhimurium*  
*Serratia marcescens*  
*Staphylococcus aureus*  
*Streptococcus faecalis*  
*Streptococcus lactis*

#### 30℃において48時間以内に発育

*Acinetobacter calcoaceticus*  
*Corynebacterium sp.*  
*Micrococcus sp.*  
*Micrococcus lyodeikticus*  
*Planococcus sp.*  
*Sarcina sp.*

性が増すにつれ陽性になった。酸性pH範囲において溶解のいくらかの証拠があった。電荷ゼロ点、すなわち粒子の表面上のゼータ電位がゼロに達するpHは以下のとおりであった。サンプル1=4.2; サンプル2=2.4; サンプル3=4.5。

ゼータ電位に対するpHをプロットした結果を第3ないし5図に示す。

#### 実施例16

##### 粒子寸法分布

4種のサンプルを検査し、そして粒子寸法を測定するために走査型電子顕微鏡 (SEM) によって写真を撮った。走査型電子顕微鏡写真を第6ないし9図に示す。各写真の下縁上の白い四角間の距離は100μmである。第6図は実施例10に記載のように製造した工業的酸酵のための基本培地を表す。第7図は、実施例1に記載のように、培地から限外ろ過によって分離し、後でスプレー乾燥した実施例1に記載したように発生した乳糖ラクトース透過物 (Express Foods Co.) からの微結晶混濁分画を表す。第8図はモザレラチーズ製造によって発生した乳糖ラクトース透過物 (Foremore-McKesson, Inc.) から製造した微結晶混濁分画を表す。微結晶混濁分画は実施例1に記載のように発生させ、培地から限外ろ過によって分離し、後でスプレー乾燥した。第9図はスイスチーズ製造によって発生した乳糖ラクトース透過物 (Foremore-McKesson, Inc.) から製造した微結晶混濁分画を表す。微結晶混濁分画は実施例1に記載のように発生させ、培地から限外ろ過によって分離し、後でスプレー乾燥した。

#### 実施例17

## 水および石油エーテル中の溶解性

実施例16 (第7ないし9図)の微結晶混濁分画の水、石油エーテル、1N HClおよび1N NaOH中への溶解性を検査した。混濁物質0.5g、1.0gおよび2.0gを各溶媒の10ml標本へ加えた。溶液を激しく振り、静置した。得られた溶解性プロフィールを表16に示す。

表 16

## 水、石油エーテル、酸/アルカリ中の溶解性

化合物	スプレードライ E.F.	スプレードライ FGA-1	スプレードライ FGA-2
水、5%固体	一時懸濁、 不溶	混濁、一部 懸濁	混濁、一部 懸濁
水、10%固体	同上	同上	同上
水、20%固体	同上	同上	同上
石油エーテル、 5%固体	不溶 (フィルム)	不溶 (フィルム)	不溶 (フィルム)
石油エーテル、 10%固体	同上	同上	同上
石油エーテル、 20%固体	同上	同上	同上
1N HCl	一時懸濁、	混濁、一部	混濁、殆ど完全
5%固体	不溶	懸濁	懸濁
1N NaOH	混濁、一部	同上(安定)	混濁、一部懸濁
20%固体	懸濁	な泡多量)	(浮遊物)

溶媒	誘電率、 25℃	スプレードライ E.F.	スプレードライ FGA-1	スプレードライ FGA-2	含湿 PGA-2
n-ブタノール	17.1	7	7	7	7
酢酸エチル	6.0	5	5	5	1
クロロホルム	4.8	5	5	5	9
(20℃)					
エチルエーテル	4.3	5	5	5	9
トルエン	2.4	7	6	5	9
ベンゼン	2.3	7	6	6	9
実用ヘキサン	1.9	7	7	7	9
(20℃)					

- 1 = 混濁、全部懸濁  
2 = 混濁、一部懸濁  
3 = 混濁、一部懸濁、浮遊物  
4 = 混濁、少し懸濁  
5 = 一部粒状懸濁  
6 = 一部粒状懸濁、浮遊物  
7 = 一時懸濁、不溶  
8 = 一時一部懸濁、不溶  
9 = 不溶

## 実施例19

## 植物油の乳化

実施例16からの微結晶混濁分画(第7および8図)の溶液を水100部中で溶った沈澱20部を振とうすることによって調製した。この溶液へ5%食酢30部を加え、得られた混合物をかきまぜると認知できるように増粘した。次にショ糖50部をかきまぜながら加え、さらに濃化した。その後液体植物油(落下生油)100部を加

化合物	スプレードライ E.F.	スプレードライ FGA-1	スプレードライ FGA-2
1N NaOH	一部可溶、上清	一部可溶、上清	一部可溶、
5%固体	黄色透明	オレンジ色 (浮遊物)	上清黄色透明 (浮遊物)
1N NaOH	一部可溶、上清	安定な暗オレン ジ色泡	一部可溶、上清
20%固体	オレンジ色透明	ジ色泡	オレンジ色透明 (浮遊物多量)

## 実施例18

## 有機液体中への溶解性

実施例10の微結晶混濁分画(第7ないし9図)の溶解性をさらに各種有機溶媒中で特徴づけた。一般に混濁物質0.5gを各溶媒5mlへ加えた。溶液を激しく振り、静置した。グリセロールの場合、5gを50mlへ加え、溶液を機械的にかきまぜた。得られた溶解性プロフィールは表17に見られる。

表 17

## 有機液体中の溶解性

## 10wt/vol.%における混濁分画の溶解性

溶媒	誘電率、 25℃	スプレードライ E.F.	スプレードライ FGA-1	スプレードライ FGA-2	含湿 PGA-2
グリセロール	42.5	2	2	2	1
メタノール	32.6	7	7	7	7
エタノール	24.3	4	7	7	7
アセトン	20.7	7	3	3	2
2-プロパノール	20.1	7	2	7	8

え、ウォーニングブレンダー中で高速で2分間ホモジナイズした。得られたエマルジョン層は少なくとも4時間安定で、マニネーズ混合物の粘度を持っていた。

対照として、微結晶混濁分画を加えずに上の操作を繰り返した。この操作は酢およびショ糖添加後混合物の濃化がないことを示した。油および水層はエマルジョンを生成せず、そして区別できる二層への分離は試みたホモジナイズ化後2分で終了した。

## 実施例20

## オレンジバルブ洗液の乳化

前実施例の操作に従い、オレンジバルブ洗液(かんきつバルブおよび破った果汁小のうのH<sub>2</sub>O可溶分画)10mlを実施例16の微結晶混濁分画2gを含む蒸留水10mlへ加えた。混合直後すべての物質は単一エマルジョン層にあり、そしてその状態を少なくとも2時間保った。約18時間後、液体の小部分がエマルジョンの下に下の透明層を形成した。第8図の微結晶混濁分画サンプルでは、エマルジョン層が固化した。

対照として、上の操作を微結晶混濁分画の添加なしで繰り返した。30分未満後下の透明な層の生成が始まり、残りのエマルジョン層は混濁分画を含むサンプルのように濃くなかった。

## 実施例21

## ヘキサンの乳化

この実施例は、本発明の微結晶混濁分画の非極性炭化水素を乳化する能力を例証する。前実施例の操作に従って、工業上ヘキサン10mlを二つの異なるソースからの微結晶混濁分画2gを含む蒸留水10mlへ加えた。混合直後、上の泡層は試験管の頂部へ広がり、こ

の泡は37分後もなおこの高さであった。約18.5時間後、両方の試験管内の泡はゼラチン状になった。

対照として、上の操作を微結晶混濁分画の添加なしで繰り返した。工業上ヘキサソおよび水はボルテックス混合終了直後別々の透明2層に完全分離した。

#### 実施例22

##### 原油の乳化

イオウ1.6%を含むサウスダコタ中間級原油を用い、油サンプル10mlを前実施例の微結晶混濁分画の両方の2gを含有する蒸留水10mlへ加えた。微結晶混濁分画を含有するサンプルは安定な2相を形成した。上相はゼラチン状になり、第8図の微結晶混濁分画は約90分でゲル化し、そして第7図のサンプルは約18時間後それほど顕著でなくゲル化した。第8図のサンプルは第7図および対照サンプルと比較してプラスチック試験管を被覆するのに比較的多る能力を示した。

対照として、上の操作を微結晶混濁分画の添加なしで繰り返した。油と水は単一液相を形成し、静置時ゲルを生成しなかった。

#### 実施例23

##### ベントナイトの乳化

この実施例は粒子状無機固体を乳化するため微結晶混濁分画を使用することを例証する。前実施例の操作に従って、ベントナイト0.2gを実施例16によって得た乾燥微結晶混濁分画2gを含有する蒸留水20mlへ加えた。第8図の微結晶混濁分画では、上の泡と、下の泡状層とが生成した。泡状層は少なくとも1時間安定であった。

対照として、上の操作を微結晶混濁分画の添加なしで繰り返した。

と同じ材料を用い、水溶液10mlを調製し、ボルテックスし、そして80℃で20分間インキュベートした。微結晶混濁分画20%の添加をもって、10%乳剤タンパク濃縮物は80℃で固化する。微結晶混濁分画の添加なしでは、10%タンパク溶液の固化は表19に示すように発生しない。

表 19

タンパク溶液のゲル化

水溶液	80℃ 20分
10%混濁分画	少し懸濁、大ベレット沈降
20%混濁分画	同上
10%WLP	混濁した懸濁液、厚いコーティング
20%WLP	固体ベレット
10%混濁分画 +	ミルク様懸濁液、ベレット
10%WLP	
10%混濁分画 +	固形ベレット
20%WLP	
20%混濁分画 +	1:1固形ベレットと厚いコーティング
10%WLP	
20%混濁分画 +	固形ベレット
20%WLP	

#### 実施例26

##### 工業的醗酵の製造

##### グルコース含量を増した培地

出発原料として20% (wt/vol) 乳剤ラクトース透過物を用いたことを除いて、透過物を実施例10のように製造する。得られた

混合直後、単一の泡状層が得られ、それは約0.5時間以内に下の透明層の存在を示した。

#### 実施例24

##### 混濁分画によるタンパクの乳化

この実施例は、タンパクを乳化およびゲル化する微結晶混濁分画の能力を例証する。Express Foods Co. から商業的に入手し得るWLPから発生した微結晶混濁分画と、Express Foods Co. からやはり商業的に入手し得るSaverpro 75乳剤タンパクを使用して100ml水溶液を調製した。サンプルを3分間高速度でウォーリングレンジャー中で泡立てた。得られたエマルジョンの泡の高さおよび粘度を記録し、微結晶混濁分画10%または20%のどちらかの添加は、10%乳剤タンパク濃縮物溶液の泡の高さおよび粘度の両方をますことを示した。結果を表18に示す。

表 18

混濁分画によるタンパクの乳化

3分間高速度で 泡立てた水溶液 100ml	100mlを200ml ビーカー中に沈降 した時の泡の高さ	粘度 (5mlがビペットから 落下する秒; H <sub>2</sub> Oが3 の値に対して)
10%WLP	1.8cm	4秒
10%WLP 10%混濁分画	2.5cm	5秒
10%WLP 20%混濁分画	3.5cm	5.8秒

#### 実施例25

##### 混濁分画によるタンパクのゲル化

タンパクを乳化することに加え、微結晶混濁分画は、ゲル化が通常起こるよりも低い濃度でタンパクをゲル化する。上に記載したの

透過物をスプレー乾燥し、実施例10のそれに関してグルコース含量を増した工業的醗酵用基本的培地を製造するのに使用する。そのような培地の一つは、固形分2.0%のスプレー乾燥した透過物の溶液を調製し、そしてAmber 510 イースト抽出物0.25%とデキストロース1.0%とを121℃/15psiで20分オートクレーブ処理する前に補強することによって製造する。得られたオートクレーブした培地は透明で金色で、そしてpH6.5を持つ。他の一つの培地は、最初固形分15%のスプレー乾燥した透過物の調製することにより製造し、溶液はpH6.5を持つ。

この溶液を37℃の温度、6ml/分の割合で、A. G. Hausser et al., Biotechnology and Biophysics **XIV**, 525-539 (1983) に記載のタイプの固定化酵素リアクターを通し、固定化酸性ラクターゼ酵素によって透過物ラクトースのグルコースおよびガラクトースへの47%転換を生ずる。この酵素変換は透過物のpH調節なしに実施し、そしてそれ故酸性ラクターゼ酵素に対して最適でないpHであった。この非最適pHの使用は47%転換を生じ、これは透過物固体を3%へ調節した時約1%グルコース濃度を生じたので、この実施例にとって望ましいものであった。得られた培地はその時1%グルコース補強した培地に匹敵した。固形分レベル3.0%へ調節し、このラクターゼ処理透過物はグルコース1.24%を含有する。Amber 510 イースト抽出物を補強し、121℃/15psiで20分間オートクレーブした3.0%ラクターゼ処理透過物は、最終pH6.5を有する透明な金色培地を与える。

この実施例のグルコース補強およびラクターゼ処理基本培地は、実施例10に記載した基本的工業用培地に関してそれらの生育支持

特性についていくつかの微生物に対して試験された。結果は下の表 20 に見られる。

(以下余白)

表 20

グルコース含量を増した工業用菌培養地中の代表的発育

	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
工業用菌培養地	++	+++	+++	+++	+++
工業用菌培養地	++	+++	+++	+++	+++
工業用菌培養地	+++	+++	+++	+++	+++

グルコース対ラクトース比の広い範囲を有する工業用培地は、デキストロース補強か、または前記のラクトース加水分解の程度を変えることによって調製することができる。特に、ラクトース加水分解の高レベルを望むならば、中性ラクトース酵素を中性緩衝系を用いて固定化し、そして透過物をリアクターを過す前に pH 調節をそれ以上行わない。さらにグルコース対ラクトース比率の異なる培地は、透過物固体の適当量をグルコースと、または透過物固体をラクターゼ処理透過物固体と乾式ブレンドすることによって調節することができる。

#### 実施例 27

##### チーズスターター培地

実施例 2 の操作に従い、しかし一次透過物を pH 8.5 - 9.0 へ調節し、そして二次透過物を Amber 510 または Amber 1003 イースト抽出物で補給することにより、ウイスクンシン州ミルウォーキーの Chris Hansen Laboratories から入手できる商業的チーズスターター培養物の生育に、および *Streptococcus cremoris* (ATCC 19257)、*Streptococcus lactis* (ATCC 19435) および *Streptococcus diacetylactis* (ATCC 15346) の培養物の生育に適当な実質上中性透明金色培地を与える。

生存プレートカウントによって測定したこれら培地上的培養物生育は、温度およびかきまぜを同じに制御し、そして外部 pH 制御を使用しない時、現在入手し得るチーズスターター培地によって生成される発育と等しい。しかしながらもし培養プロセスを pH 5.0 ないし 5.5 の範囲に維持するように塩基の添加によって pH を制御すれば、細胞密度は現在入手し得る市販培地で得られるよりも 5 ないし

10 倍に達する。さらに、これら生育レベルは、内部リン酸緩衝系を含む Nordica, In-Sore および Phase 4 のような市販培地で典型的に必要とする 16 - 20 時間に対し、適当な接種で 8 時間で再現可能に得られる。

以上の実施例は、本発明の一般的特定の記載した反応剤および/または作業条件をもって実施例中に特定の使用したそれらに代替することによって類似の成功度をもって反復することができる。以上の説明から、本発明が関係する分野の当業者はその必須の特徴を容易に確かめることができ、そして本発明の精確および範囲から逸脱することなく、種々の用途および条件にそれを適応するように種々の変更および修飾をなすことができる。

##### 産業上の利用

本明細書および実施例から見られるように、本発明は、これまで廃物と通常考えられていたラクトースリッチ酪乳類透過物から複数の商業的に有用な製品の提供に置いて産業上有用である。一つの主要生産物は多種類の微生物の良好な生育を支持し得る微生物培地を含み、第 2 の生産物は多種類の製品を乳化または安定化し得る食品級乳化または安定剤を含む。

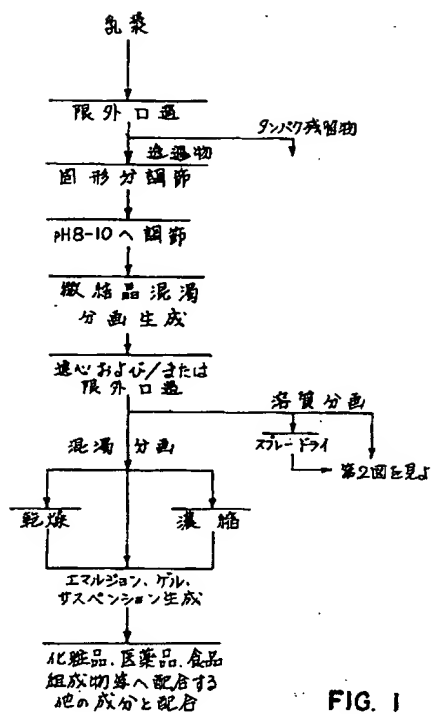


FIG. 1

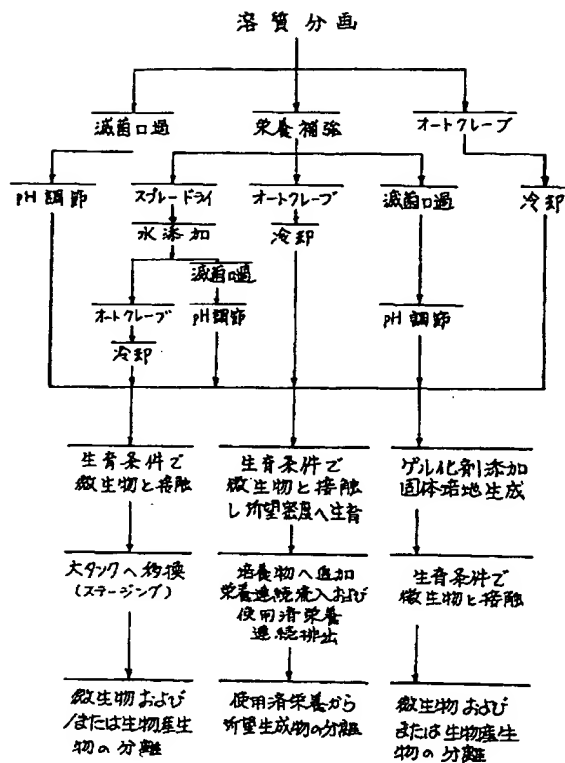


FIG 2

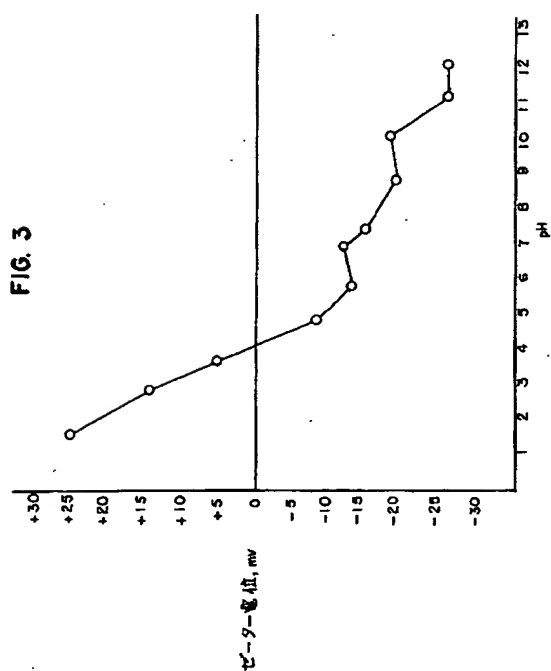


Figure 4 is a graph showing the relationship between the logarithm of the concentration of the solution ( $\lg C$ ) on the x-axis and the electromotive force ( $E$ ) in millivolts on the y-axis. The x-axis ranges from 1 to 13, and the y-axis ranges from -30 to +30 mV. The data points, represented by open squares, show a sharp increase in  $E$  from approximately -12 mV at  $\lg C = 4$  to +30 mV at  $\lg C = 13$ . A dashed line connects the points, and a vertical line is drawn at  $\lg C = 3.5$ .

$\lg C$	$E$ (mV)
1	+30
2	+25
3	+20
4	+15
5	+10
6	+5
7	0
8	-5
9	-10
10	-12
11	-10
12	-5
13	+30



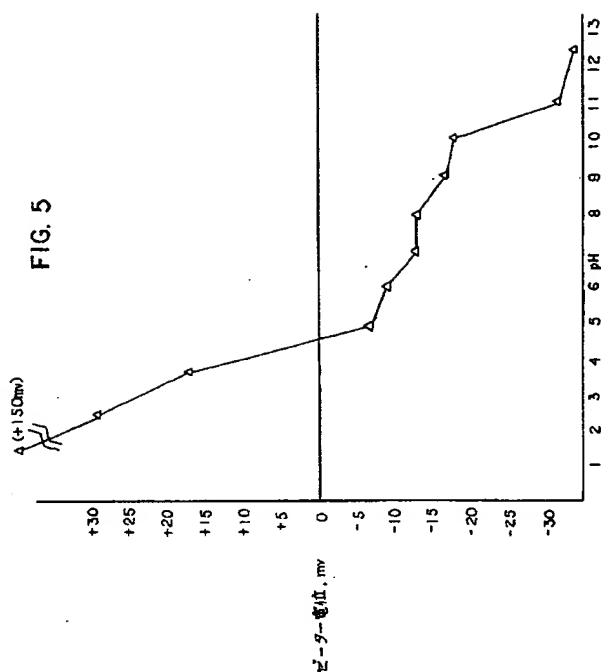


FIG. 7

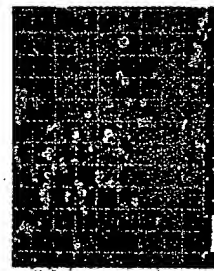


FIG. 9

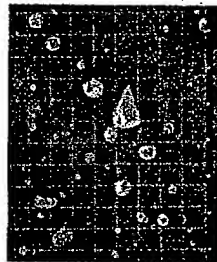


FIG. 6

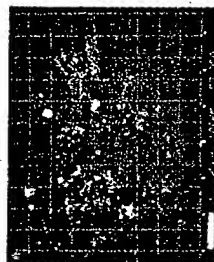


FIG. 8

補正書のほん訳文提出書  
(特許法第184条の7第1項)

(補正の内容)  
請求の範囲

昭和59年5月14日

特許庁長官 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US83/01342

2. 発明の名称

清澄化した酪酸乳糖ラクトース透過物を培地および他の商業的に有用な製品への転換

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 21045メリーランド、コロンビア、  
レッドプランチロード 9110

名称 アイジーアイ、バイオテクノロジー、  
インコーポレイテッド

代表者 ミルチ、ロバート オースチン

国籍 アメリカ合衆国

4. 代理人

住所 大阪市東区淡路町2丁目40番地4 弘栄ビル

氏名 (5036) 弁理士 赤岡 通夫

5. 補正書の提出年月日

1984年2月21日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書のほん訳文

1通



1. a) i) 約7以下のpHを有する透明な明るい着色した溶質を生成するように10~20分間121℃および15psiでオートクレービングすることができるラクトースリッチ水性溶質相と、  
ii) 前記溶質相のオートクレービング時沈澱を形成しかつ水および石油エーテルに不溶な無味、無臭、白色自由流動性粉末を形成するように乾燥し得る、酪酸乳糖透過物からの溶解固形分の実質上すべてを含む微結晶固体相を生成するように、約7以下のpHを有する酪酸乳糖透過物のpHを約8ないし10のpHへ上昇させ、

b) 前記微結晶固体相を前記水性溶質相から分離し、

c) 該微結晶固体相および該水性溶質相の少なくとも一方を回収すること

を含む改良された微生物培養培地性を有する水性液相と、そして改良された乳化性を有する微結晶固相とより実質的に商業的に有用な製品へ、除タンパクした酪酸乳糖透過物を分離する方法。

2. pHは約9へ上昇せられる第1項の方法。

3. 前記微結晶混濁分画は前記溶質相から20~100kdaのフィルターを通す限外ろ過によって分離される第1項の方法。

4. 前記水性溶質相が回収され、回収した溶質相のpHを約6.8~7.1へ下げることさらに含む第1項の方法。

5. pHは該溶質相へ無毒性ルイス酸の添加によって下げられる第4項の方法。

6. pHは該溶質相を無菌微生物培地が生成するようにオートクレーブ処理することによって下げられる第4項の方法。
7. pHは該溶質相へ外来酸の添加なしで下げられる第5項の方法。
8. 前記水性溶質相が回収され、回収された溶質相を10重量%未満の水分含量へスプレー乾燥することをさらに含む第1項の方法。
9. 前記微結晶固体相および約100kda以下分子量を有する成分を運す孔径を有するフィルターによって保留される成分を實質上含まず、かつ約10kda以上の分子量を有する成分を保留する孔径を持つフィルターを通過する成分の實質上すべてを含有する、第1項の方法によって得られた回収された溶質相より實質的になる、適当な生育条件で微生物の生育を支持することができる微生物培養培地。
10. 約30kdaの分子量を有する成分を通過させる孔径を有するフィルターによって保留される成分を實質上含まない第9項の微生物培養培地。
11. 約6.8-7.1のpHを有する第9項の微生物培養培地。
12. 約3.5% (wt/vol) の固形分含量を有する第9項の微生物培養培地。
13. 第9項による無菌微生物培養培地。
14. 約10重量%未満の水分含量を有する自由流動性粉末の形の第9項による微生物培養培地。
15. 外来の無毒性同化炭素源の生育促進量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
16. 前記炭素源はグルコースである第15項の微生物培養培地。
17. 外来の無毒性同化窒素源の生育促進量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
25. 生存している微生物と適当なその栄養培地を含むバルク微生物スターター混合物において、前記スターター混合物は第9項の微生物培養培地である改良。
26. 前記微生物はチーズ生産微生物である第25項のバルクスターター混合物。
27. 同化炭素、窒素およびリン源を含有する培地中において深部培養栄養生育条件下において生体外において微生物を生育する方法において、前記培地は第9項の培地である改良。
28. 微生物はバクテリアである第27項の方法。
29. 微生物は *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Kluyvermyces* および *Saccharomyces* 種よりなる群から選ばれる第27項の方法。
30. 微生物は *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* である第27項の方法。
31. 微生物は *Aspergillus*, *Penicillium* および *Streptomyces* 種よりなる群から選ばれる第27項の方法。
32. 微生物は *Penicillium notatum* である第31項の方法。
33. 微生物は *Streptomyces griseus* である第31項の方法。
34. 微生物は臨床的分離物から得られる第27項の方法。
35. 前記微結晶固体相が回収され、無味、無臭、白色自由流動性であり、さらに水および石油エーテルに不溶であることを特徴とする粉末を生成するように回収した微結晶固体相を乾燥することをさらに含む第1項の方法。
36. 第35項の方法によって得られた無味、無臭、白色自由流動性粉末より實質的になる無毒性食品級添加剤。
37. 添加した湿潤剤、安定剤、乳化剤、または濃化剤の有効量を含生物培養培地。
18. 前記栄養源はイースト抽出物、イースト自己消化物、加水分解したカゼイン、大豆タンパクまたは大豆タンパク加水分解物、またはそれらの混合物である第17項の微生物培養培地。
19. 無毒性ゲル化剤の有効量をさらに含む第9項の微生物培養培地。
20. 約0.25%の水溶性醸造者イースト抽出物をさらに含み、約3.5% (wt/vol) の固形分含量を有することを特徴とする、醗酵培地の栄養生育特性を持つ第9項の微生物培養培地。
21. 加水分解したカゼイン約0.25-0.5%、イースト抽出物約0.05%および約0.05-0.1%の総グルコース含量をさらに含み、ペンアッセイブロスまたは栄養ブロスに比肩し得る栄養生育特性を有する第9項の微生物培養培地。
22. その内へ酸基の拡散を減らす無毒性ゲル化剤の有効量と、加水分解したカゼイン約0.25-0.5%と、イースト抽出物約0.5%と、システイン HCl約0.05%と、約0.5%の総グルコース含量とをさらに含み、チオグリコレートブロスに比肩し得る栄養生育特性を有する第9項の微生物培養培地。
23. 加水分解したカゼイン約0.25%、イースト抽出物約1%、システイン HCl約0.2%、ヘミン約0.05%、ビタミンK<sub>3</sub>約0.1%、約0.5%の総グルコース含量、約7.8のpH、-150mVまたはそれ以下の酸化還元電位、および酸化還元比色定量用指示薬の有効量をさらに含み、嫌気性バクテリアの培養に適した第9項の微生物培養培地。
24. 前記指示薬は約0.001%のレザズリンである第23項の微生物培養培地。
38. 複数の不混和物質へ乳化剤または安定剤を添加することによりそれらの安定なエマルジョンまたはサスペンションを形成する方法において、前記乳化剤または安定剤は第36項の微結晶混合物分画である改良。
39. 前記不混和性物質はその主要部分として油と水を含んでいる第38項の方法。
40. 油は食用植物油である第39項の方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/US83/01342

<p><b>I. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER</b> (In several classifications, give the class, indicate all)</p> <p>INT. CL. A61K 7/00, 16; A23C 21/00, 02; C12H 1/20, 14, 16</p> <p>U.S. CL. 426/49, 426/41, 583, 602, 654, 657, 491; 435/253, 254, 255, 256, 832, 853, 897, 913, 936, 941</p> <p><b>A. FIELD OF SEARCH</b></p> <p>Microfilm Documentation Searched:</p> <p>Classification System:</p> <p>U.S. 260/112R; 426/49, 359; 426/41, 43, 583, 602, 654, 657, 491; 435/253, 254, 255, 256, 832, 853, 897, 913, 936, 941</p> <p>Documentation Searched other than Microfilm Documentation in the Event that such Documents are Included in the Field Searched:</p>																																
<p><b>II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **</th> <th>Reference to Claim No. **</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US, A, 4,209,503, PUBLISHED 24 JUNE 1980, SHAH ET AL.</td> <td>1,2,35-40</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US, A, 4,143,174, PUBLISHED 06 March 1979, SHAH ET AL.</td> <td>1,2,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,036,999, PUBLISHED 19 JULY 1977, GRINDSTAFF.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 3,930,039, PUBLISHED 30 DECEMBER 1975, KUIFERS.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 3,922,375, PUBLISHED 25 NOVEMBER 1975, DALAN ET AL.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,202,909, PUBLISHED 13 MAY 1980, PEDERSON, JR.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 2,123,203, PUBLISHED 12 JULY 1938, FICKE ET AL.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,042,575, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4,042,576, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.</td> <td>1-8,35-40</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **	Reference to Claim No. **	X	US, A, 4,209,503, PUBLISHED 24 JUNE 1980, SHAH ET AL.	1,2,35-40	X	US, A, 4,143,174, PUBLISHED 06 March 1979, SHAH ET AL.	1,2,35-40	A	US, A, 4,036,999, PUBLISHED 19 JULY 1977, GRINDSTAFF.	1-8,35-40	A	US, A, 3,930,039, PUBLISHED 30 DECEMBER 1975, KUIFERS.	1-8,35-40	A	US, A, 3,922,375, PUBLISHED 25 NOVEMBER 1975, DALAN ET AL.	1-8,35-40	A	US, A, 4,202,909, PUBLISHED 13 MAY 1980, PEDERSON, JR.	1-8,35-40	A	US, A, 2,123,203, PUBLISHED 12 JULY 1938, FICKE ET AL.	1-8,35-40	A	US, A, 4,042,575, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.	1-8,35-40	A	US, A, 4,042,576, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.	1-8,35-40
Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **	Reference to Claim No. **																														
X	US, A, 4,209,503, PUBLISHED 24 JUNE 1980, SHAH ET AL.	1,2,35-40																														
X	US, A, 4,143,174, PUBLISHED 06 March 1979, SHAH ET AL.	1,2,35-40																														
A	US, A, 4,036,999, PUBLISHED 19 JULY 1977, GRINDSTAFF.	1-8,35-40																														
A	US, A, 3,930,039, PUBLISHED 30 DECEMBER 1975, KUIFERS.	1-8,35-40																														
A	US, A, 3,922,375, PUBLISHED 25 NOVEMBER 1975, DALAN ET AL.	1-8,35-40																														
A	US, A, 4,202,909, PUBLISHED 13 MAY 1980, PEDERSON, JR.	1-8,35-40																														
A	US, A, 2,123,203, PUBLISHED 12 JULY 1938, FICKE ET AL.	1-8,35-40																														
A	US, A, 4,042,575, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.	1-8,35-40																														
A	US, A, 4,042,576, PUBLISHED 16 AUGUST 1977, EUSTACHE.	1-8,35-40																														
<p>* Special categories of cited documents: 10</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"X" prior document but published on or after the international filing date</p> <p>"Y" document which may show aspects of novelty claimed or which is cited to establish the prior art of another document or for a special reason (35 specified)</p> <p>"O" document referred to in oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>** "T" later document published after the international filing date as priority claim and not in conflict with the substance but which is considered the principle or basis of the invention</p> <p>** "C" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered in conflict with the invention</p> <p>** "D" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents or with the prior art</p> <p>** "L" document number of the same page handy</p>																																
<p><b>III. CERTIFICATION</b></p> <p>Date of the Actual Completion of the International Search: 16 DECEMBER 1983</p> <p>Date of Mailing of this International Search Report: 21 DEC 1983</p> <p>International Searching Authority: ISA/US</p> <p>DAVID H. RAFF</p>																																

特表昭59-501933 (18)

International Application No. PCT/US83/01342

<p><b>II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **</th> <th>Reference to Claim No. **</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y, E</td> <td>US, A, 4,401,986, PUBLISHED 06 SEPTEMBER 1983, SINKOFF ET AL.</td> <td>9-21, 23-29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 63, ISSUED 1980, STIEBER ET AL., PRODUCTION OF LACTOBACILLUS CELLS BY DIALYSIS CONTINUOUS FERMENTATION OF DEPROTEINIZED WHEY, PAGES 722-730.</td> <td>9-34</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 30, ISSUED 1947, ROGOSA ET AL., ETHYL ALCOHOL FROM WHEY, PAGES 263-269.</td> <td>9-34</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>W, PROC. WHEY UTIL. CONF., UNIV. PARK MD., WIDA, ARE 73-89 ISSUED 1973, WHEY FERMENTATION, PAGES 48-60.</td> <td>9-34</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 84:72629U ISSUED 1976, CELIKOL ET AL., WHEY AS A CULTURE MEDIUM, PAGES 321 AND 322.</td> <td>9-34</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 95:59904H ISSUED 1981, PROSTAKOV ET AL., PRODUCTION OF HYDROLYZATES FROM WHEY FOR PREPARING A CULTURE MEDIUM, PAGE 531.</td> <td>9-34</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **	Reference to Claim No. **	Y, E	US, A, 4,401,986, PUBLISHED 06 SEPTEMBER 1983, SINKOFF ET AL.	9-21, 23-29	Y	W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 63, ISSUED 1980, STIEBER ET AL., PRODUCTION OF LACTOBACILLUS CELLS BY DIALYSIS CONTINUOUS FERMENTATION OF DEPROTEINIZED WHEY, PAGES 722-730.	9-34	A	W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 30, ISSUED 1947, ROGOSA ET AL., ETHYL ALCOHOL FROM WHEY, PAGES 263-269.	9-34	A	W, PROC. WHEY UTIL. CONF., UNIV. PARK MD., WIDA, ARE 73-89 ISSUED 1973, WHEY FERMENTATION, PAGES 48-60.	9-34	Y	W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 84:72629U ISSUED 1976, CELIKOL ET AL., WHEY AS A CULTURE MEDIUM, PAGES 321 AND 322.	9-34	A	W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 95:59904H ISSUED 1981, PROSTAKOV ET AL., PRODUCTION OF HYDROLYZATES FROM WHEY FOR PREPARING A CULTURE MEDIUM, PAGE 531.	9-34
Category *	Character of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant paragraph **	Reference to Claim No. **																					
Y, E	US, A, 4,401,986, PUBLISHED 06 SEPTEMBER 1983, SINKOFF ET AL.	9-21, 23-29																					
Y	W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 63, ISSUED 1980, STIEBER ET AL., PRODUCTION OF LACTOBACILLUS CELLS BY DIALYSIS CONTINUOUS FERMENTATION OF DEPROTEINIZED WHEY, PAGES 722-730.	9-34																					
A	W, JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, VOL. 30, ISSUED 1947, ROGOSA ET AL., ETHYL ALCOHOL FROM WHEY, PAGES 263-269.	9-34																					
A	W, PROC. WHEY UTIL. CONF., UNIV. PARK MD., WIDA, ARE 73-89 ISSUED 1973, WHEY FERMENTATION, PAGES 48-60.	9-34																					
Y	W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 84:72629U ISSUED 1976, CELIKOL ET AL., WHEY AS A CULTURE MEDIUM, PAGES 321 AND 322.	9-34																					
A	W, CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 95:59904H ISSUED 1981, PROSTAKOV ET AL., PRODUCTION OF HYDROLYZATES FROM WHEY FOR PREPARING A CULTURE MEDIUM, PAGE 531.	9-34																					

第1頁の続き

優先権主張 ②1983年3月2日③米国(US)  
③471570

- ⑦発明者 サイバート・エドワード・エム  
アメリカ合衆国21043メリーランド・エ  
リコットシティ・ロンバルディドライブ  
10392
- ⑦発明者 メイズ・トーマス・ディー  
アメリカ合衆国21046メリーランド・コ  
ロンビア・アーリースプリングウェイ97  
74
- ⑦発明者 ミルチ・ロバート・オースチン  
アメリカ合衆国21208メリーランド・ボ  
ルチモア・エクステンディット・パーク  
ハイツアベニュー8406